

From: STIC-ILL
Sent: Friday, March 08, 2002 2:28 PM
To: STIC-FPAS
Subject: FW: please provide a copy of the foreign document.

-----Original Message-----

From: Goldberg, Jeanine
Sent: Friday, March 08, 2002 2:16 PM
To: STIC-ILL
Subject: please provide a copy of the foreign document.

RESULT 9
E03959
LOCUS E03959 1241 bp DNA PAT 29-SEP-1997
DEFINITION The VT2 gene of Verotoxin-producing Escherichia coli.
ACCESSION E03959
VERSION E03959.1 GI:2172170
KEYWORDS JP 1992297488-A/1.
SOURCE synthetic construct.
ORGANISM synthetic construct
artificial sequence.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1241)
AUTHORS Takeda, Y. and Yamazaki, S. .
TITLE DETECTION OF VERO TOXIN GENE AND PRIMER TO BE USED THEREFOR
JOURNAL Patent: JP 1992297488-A 1 21-OCT-1992;
SHIONOGI & CO LTD
COMMENT PN JP 1992297488-A/1
PD 21-OCT-1992
PF 26-MAR-1991 JP 1991087610

Jeanine Enewold Goldberg
1634
CM1--12D11
Mailbox-- 12E12
306-5817

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-297488

(43) 公開日 平成4年(1992)10月21日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	弁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 H 21/04	Z N A B	7822-4C		
C 1 2 N 15/11				
C 1 2 Q 1/68	A	8114-4B		

審査請求 未請求 請求項の数6(全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平3-87610	(71) 出願人	000001926 塩野義製薬株式会社 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
(22) 出願日	平成3年(1991)3月26日	(72) 発明者	竹田 美文 京都府京都市上京区中立売通室町西入三丁目471-514
		(72) 発明者	山崎 伸二 京都府京都市中京区小川通丸太町下中之町78-501
		(74) 代理人	弁理士 岩崎 光隆

(54) 【発明の名称】 V e r o 毒素遺伝子の検出方法およびそれに用いるプライマー

(57) 【要約】 (修正有)

【構成】5種のVero毒素遺伝子、すなわち、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhh遺伝子全てに対して高い相同性を有するプライマーならびに、このプライマーを用いるPCR法によるVero毒素遺伝子の検出方法。該プライマーは、15～25塩基長を有し且つ、塩基配列；
 5' G A R C R A A A T A A T T T A T A T G T G T
 3' または5' T G A T G A T G R C A A T T C A G
 T A T 3' (但し、RはAまたはGを表わす。)のうち、少なくとも連続した15塩基またはその相補鎖を有する。

【効果】この検出方法によると、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、VT2vhh遺伝子のいずれをも検出することが可能であり、Vero毒素産生性大腸菌の迅速な検出が可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhh遺伝子全てに対して高い相同性を有するプライマー。

【請求項2】 該遺伝子全てに対して、同一、または、1～2塩基しか異なることを特徴とする請求項1記載のプライマー。

【請求項3】 15～25塩基長を有する請求項1記載のプライマー。

【請求項4】 塩基配列：5' GARCRAAATAATTTATATGTG 3'または5' TGATGATGCAATTCAGTAT 3'

(但し、RはAまたはGを表わす。)のうちの、少なくとも連続した15塩基またはその相補鎖を有する請求項1記載のプライマー。

【請求項5】 塩基配列：5' GAGCGAAATAATTTATATGTG 3'または5' TGATGATGGCAATTCAGTAT 3'

のうちの、少なくとも連続した15塩基またはその相補鎖を有する請求項1記載のプライマー。

【請求項6】 請求項1～5のいずれかに記載のプライマーを用いることを特徴とする、PCR法によるVero毒素遺伝子の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、PCR (DNA増幅) 法によるVero毒素遺伝子の検出方法およびそれに用いるプライマーに関する。

【0002】

【従来の技術】 Vero毒素産生性大腸菌(Verotoxin-producing *Escherichia coli*, VTEC)による出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群の報告例は、我が国においても年々増加の傾向にある。下痢と腹痛を伴う症状から短期間で溶血性尿毒症症候群を続発し、死亡する例も報告されており、VTECの迅速な検出・同定法の確立が急務とされている。

【0003】 本菌感染において重要な病原的役割を果たすと考えられているVero毒素(VT)は、現在までに少なくとも5種類が報告されている。すなわち、志賀赤痢菌の産生する志賀毒素と分子構造が全く同一のVT1、生物学的性状はVT1と類似しているが免疫学的物理化学的性状が全く異なるVT2、VT2と一部共通抗原性を有する豚浮腫病由来の大腸菌が産生するVT2vp、VT2と一部共通抗原性を有し溶血性尿毒症症候群患者由来の大腸菌の産生するVT2vha、VT2vhhの5種類である。

【0004】 この5種類のVTのDNA配列は、以下の通り、既に報告されている。

VT1: Microbial Pathogenesis 1987, 2: 147-153

J. Bacteriol., Sept. 1987, p. 4313-4319, Vol. 169, No. 9

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, pp. 4364-4368, July 1987

Microbial Pathogenesis 1988, 5: 357-369

VT2: FEMS Microbiology Letters 44 (1987) 109-114 (配列番号: 1)

VT2vp: Microbial Pathogenesis 1988, 5: 419-426

J. Bacteriol., Sept. 1988, p. 4223-4230, Vol. 170, No. 9

VT2vha, VT2vhh: Microbial Pathogenesis 1990, 8: 47-60

【0005】 また、VT1遺伝子およびVT2遺伝子のそれぞれをPCR法により増幅したという報告が既になされている。

VT1: The Journal of Infectious Diseases 1990;162:1195-1198

VT2: Journal of Clinical Microbiology, Oct. 1990, p. 2351-2353, Vol. 28, No. 10

【0006】 このように、VT1遺伝子およびVT2遺伝子のPCR法による増幅の報告はあるものの、それ以外のVT2vp、VT2vha、VT2vhh遺伝子の増幅に関する報告は無く、さらに、これら5つの遺伝子全てを増幅させるプライマーの報告も無い。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 上記の通り、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhh遺伝子全てに共通なプライマーは未だ報告されておらず、現在のところVTECの検出のためには、各遺伝子それぞれを別個に検出せざるをえない。これらはVTECの迅速な検出法とは言いがたく、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhh遺伝子全てをPCR法で増幅し得るプライマーが待望されていた。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明は、PCR法によって、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhh遺伝子全てを増幅し得るプライマーを提供する。

【0009】 本発明のプライマーは、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhh遺伝子全てに対して高い相同性を有するものである。すなわち、本発明のプライマーは、連続した15～25塩基長を有し、5つの遺伝子それぞれに対して、同一か、または、1～2塩基しか異なることを特徴とする。

【0010】 具体的には、5つの遺伝子の配列を比較して(図1および図2参照)、これらの遺伝子配列の相同性が高い、以下の部分から本発明のプライマーがデザインされる(「-」は同一塩基)。

【0011】

VT1 : ...-A-G-.....

VT2 : ...GAGCAAAATAATTTATATGTG...

VT2vp : ...-A-G-.....

VT2vha :
.....

VT2vhh :
.....

(図1参照)

50 【0012】

3

VT1 :T.....
 VT2 : ...ATACTGAATGGCATCATCA...
 VT2vp :
 VT2vha :
 VT2vhh :

(図2参照)

【0013】この部分を選択すれば、15～25塩基にわたり、各遺伝子に対して、同一または1～2塩基だけ異なるプライマーをデザインすることができる。例えば、

センスプライマー：5' GARCRAATAATTTATATGTG 3' (配列番号：2)

アンチセンスプライマー：5' TGATGATGRCATTCAGTAT 3' (配列番号：3)

(但し、RはAまたはGを表わす。)なるプライマーをデザインできる。

【0014】さらに詳細には、本発明に用いられたプライマーは、

センスプライマー：5' GAGCGAAATAATTTATATGTG 3' (配列番号：2)

アンチセンスプライマー：5' TGATGATGGCAATTCAGTAT 3' (配列番号：3)

である。これらは、各遺伝子に対して、同一または1塩基しか異なる。

【0015】これらのプライマーに対する相補鎖も、もちろん本発明のプライマーとして用いることができる。また、これらのプライマーを数塩基短縮または延長しても、15～25塩基にわたり、各遺伝子に対して、同一または1～2塩基だけ異なるものとなることは図1および図2から明らかであり、そのようなものも本発明の範囲に含まれる。

【0016】通常、PCR法に用いるプライマーは、15塩基以上であると、所望の特異性が得られる。従って、本発明のプライマーも15塩基以上であることが望ましく、上記の配列のうち、少なくとも連続した15塩基またはその相補鎖を有するプライマーも本発明に包含される。

【0017】本発明のプライマーは、PCR法によるVT遺伝子の検出用プライマーとして用いられるだけでなく、VT遺伝子の検出用プローブとして用いることもできる。従って、本発明のプライマーと同一の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドは、その用途に限定されず、すべて本発明に包含される。

【0018】本発明のプライマーを用いるPCR法によるV

配列

ATGAAGTGA TATTATTAA ATGGGTACTG TGGCTGTAC TGGGTTTTTC TTCGGTATCC	60
TATTCGGGG AGTTTACGAT AGACTTTTCG ACCCAACAAA GTTATGTCTC TTCGTTAAAT	120
AGTATACGGA CAGAGATATC GACCCCTCTT GAACATATAT CTCAGGGGAC CACATCGGTG	180
TCTGTTATTA ACCACACCCC ACCGGGCAGT TATTTGCTG TGGATATACG AGGGCTTGAT	240
GTCTATCAGG CGCGTTTGA CCATCTTCGT CTGATTATTG AGCAAAATAA TTTATATGTG	300

4

T遺伝子の検出は、通常の方法で行なえばよい。例えば、被検菌を溶菌させたのち、Taq DNAポリメラーゼを加え、変性(94℃、1分)→アニーリング(58℃、1.5分)→合成(72℃、1.5分)の反応を約30回繰り返し、増幅したDNA断片をポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出すればよい。

【0019】

【実施例】プライマー：それぞれのVTをコードする遺伝子の塩基配列を比較して(図1および図2参照)、相溶性が高い領域を検索し、以下の配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

センスプライマー：5' GAGCGAAATAATTTATATGTG 3' (配列番号：2)

アンチセンスプライマー：5' TGATGATGGCAATTCAGTAT 3' (配列番号：3)

【0020】使用菌株：各VTの陽性コントロールとして、VT1、VT2、VT2vha、VT2vhhについては、クローニング株を、VT2vpについては、オリゴプローブでVT2vp以外のVTは保持していないことを確認した菌株を用いた。

【0021】PCR：DNAの増幅反応は、10 mM Tris-HCl (pH8.5)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.01%(W/V)ゼラチン、200 μM各dNTP、および1 μM各プライマーを含む溶液に、被検菌の培養液1 μlを加えた反応溶液100 μlを94℃、5分間で溶菌させた後、Taq DNAポリメラーゼ2.5単位を加え、変性(94℃、1分)→アニーリング(58℃、1.5分)→合成(72℃、1.5分)の反応を30回繰り返した。増幅したDNA断片は、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出した。

【0022】結果：増幅したDNA断片を、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出した結果を、図3に示す。図3から明らかな様に、本発明のプライマーを用いてPCRを行なえば、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、VT2vhh遺伝子のいずれか1つを保持する菌株について、所望の位置にバンドが検出され、いずれをも保持しない菌株では、バンドが検出されなかった。

【0023】

【発明の効果】本発明のプライマーを用いるVT遺伝子の検出方法によると、VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、VT2vhh遺伝子のいずれでも検出することが可能であり、VTECの迅速な検出が可能になる。

【配列表】

【0024】配列番号：1

配列の長さ：1241

配列の型：核酸

5	6	
GCCGGGTTCC	TTAATACGGC	AACAAATACT TTCTACCGTT TTTCAGATTI TACACATATA 360
TCAGTGCCCG	GTGTGACAAC	GGTTTCCATG ACAACGGACA GCAGTTATAC CACTCTGCAA 420
CGTGTCCGAG	CGCTGGAACG	TTCCGGAATG CAAATCAGTC GTCACCTACT GGTTCATCA 480
TATCTGGCGT	TAATGGAGTT	CAGTGGTAAT ACAATGACCA GAGATGCATC CAGAGCAGTT 540
CTGCGTTTTG	TCACTGTCAC	AGCAGAAGCC TTACGCTTCA GGCAGATACA GAGAGAATTT 600
CGTCAGGCAC	TGCTCTGAAC	TGCTCCTGTG TATACGATGA CGCCGGGAGA CGTGGACCTC 660
ACTCTGAAGT	GGGGGCGAAT	CAGCAATGTG CTTCGGGAGT ATCGGGGAGA GGATGGTGTC 720
AGAGTGCGGA	GAATATCCTT	TAATAATATA TCAGCGATAC TGGGGACTGT GGCCGTTATA 780
CTGAATTGCC	ATCATCAGGG	GGCGCGTTCT GTTCGCGCCG TGAATGAAGA GAGTCAACCA 840
GAATGTCAGA	TAACTGGCGA	CAGGCCTGTT ATAAAAATAA ACAATACATT ATGGGAAAGT 900
AATACAGCTG	CAGCGTTTCT	GAACAGAAAG TCACAGTTTT TATATACAAC GGGTAAATAA 960
AGGAGTTAAG	CATGAAGAAG	ATGTTTATGG CGGTTTTATT TGCAATTAGCT TCTGTTAATG 1020
CAATGGGCGC	GGATTGTGCT	AAAGGTAAAA TTGAGTTTTC CAAGTATAAT GAGGATGACA 1080
CATTTCAGAT	GAAGGTTGAC	GGGAAAGAAT ACTGGACCAG TCGCTGGAAT CTGCAACCGT 1140
TACTGCAAGG	TGCTCAGTTG	ACAGGAATGA CTGTACAAAT CAAATCCAGT ACCTGTGAAT 1200
CAGGCTCCGG	ATTGCTGAA	GTGCAGTTTA ATAATGACTG A 1241

【0025】配列番号: 2配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

※配列の種類: 他の核酸 合成DNA

※ アンチセンス: No

配列

GARCRAAATA ATTTATATGT G

21

【0026】配列番号: 3

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

※配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: Yes

※

配列

TGATGATGRC AATTCAGTAT

20

【図面の簡単な説明】

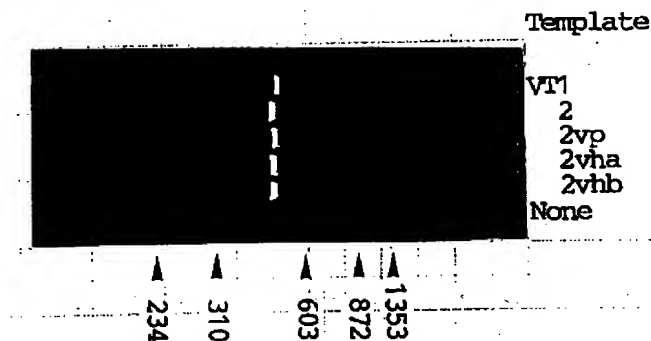
【図1】VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhb遺伝子の配列を比較した図である。「-」はVT2遺伝子の配列と同一であることを示し、「+」は欠失を示す。四角で囲った部分は、プライマーの設計に選択された部分である。

【図2】VT1、VT2、VT2vp、VT2vha、およびVT2vhb遺伝

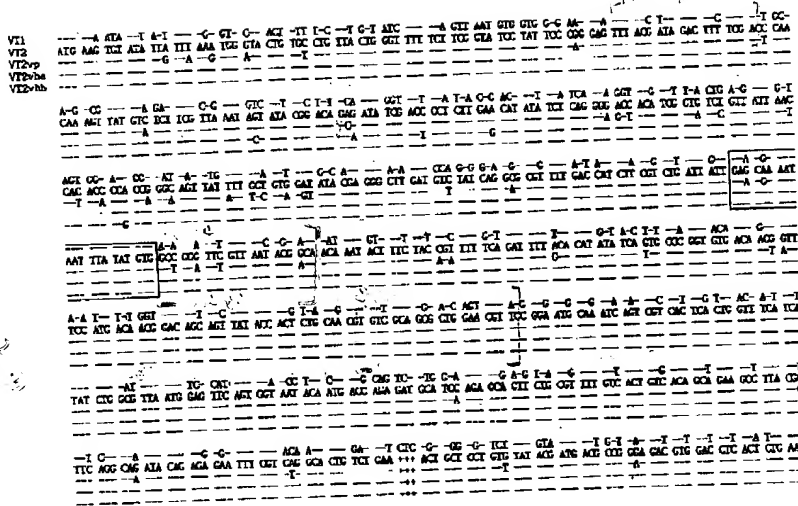
子の配列を比較した図であり、図1の続きである。「-」はVT2遺伝子の配列と同一であることを示し、「+」は欠失を示す。四角で囲った部分は、プライマーの設計に選択された部分である。

【図3】本発明の方法により増幅したDNA断片を、6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により検出した結果を示す図である。

【図3】



【図1】



【図2】

